

BASE MATERIAL FOR REGENERATING CARTILAGINOUS TISSUE AND REGENERATING METHOD OF CARTILAGINOUS TISSUE USING THE SAME

Publication number: JP10234844 (A)

Publication date: 1998-09-08

Inventor(s): MORITA SHINICHIRO; HONDA MASAKI; UEDA MINORU; KIMATA HIROHARU

Applicant(s): GUNZE KK

Classification:

- international: A61L27/00; C12N5/07; C12N5/077; A61L27/00; C12N5/07; C12N5/077;
(IPC1-7): A61L27/00; C12N5/06

- European:

Application number: JP19970058398 19970225

Priority number(s): JP19970058398 19970225

Abstract of JP 10234844 (A)

PROBLEM TO BE SOLVED: To enable decomposition and absorption of a cartilaginous tissue after the elapsing of a specified period with easier formation of the tissue by forming a sponge-like molded product having a cell holding structure out of a polycondensation body of any of lactic acid, glycolic acid and caprolactone or a copolymer thereof to make it adapted to the proliferation of cartilaginous cells.

SOLUTION: Material herein used is a polycondensation body of any of lactic acid, glycolic acid and caprolactone or copolymer thereof, the example, a copolymer of lactic acid and glycolic acid. This copolymer is properly treated and molded as desired in a porous form to make a sponge-like molded product for surgery. The pore diameter of the molded product is not limited if the structure thereof can hold cells, preferably cartilaginous cells. But, normally, the pore diameter is about 1mm or less, preferably about 5-100 μ m. The density of the product is about 0.1-10g/cm³, preferably about 1-5g/cm³. This structure can improve breaking strength, breaking by elongation and elasticity thereby easily producing a mold according to the figure of a patient. This also enables regeneration of a cartilaginous tissue in a short time.

Data supplied from the *esp@cenet* database — Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-234844

(43) 公開日 平成10年(1998) 9月8日

(51) Int.Cl.⁶

識別記号

F I

A 6 1 L 27/00

A 6 1 L 27/00

U

C 1 2 N 5/06

C 1 2 N 5/00

E

審査請求 未請求 請求項の数6 F D (全 7 頁)

(21) 出願番号 特願平9-58398

(22) 出願日 平成9年(1997) 2月25日

(71) 出願人 000001339

グンゼ株式会社

京都府綾部市青野町膳所1番地

(72) 発明者 森田 真一郎

京都府綾部市井倉新町石風呂1番地 グン
ゼ株式会社京都研究所内

(72) 発明者 本田 雅規

愛知県大府市東新町5丁目55番地

(72) 発明者 上田 実

愛知県日進市岩崎台2-415-1

(72) 発明者 木全 弘治

愛知県名古屋市天白区植田山1-1404

(74) 代理人 弁理士 三枝 英二 (外4名)

(54) 【発明の名称】 軟骨組織再生用基材及びこれを用いた軟骨組織再生法

(57) 【要約】

【課題】軟骨細胞増殖の為の最適な足場となり、適度な強度を有して目的の軟骨組織の形状を容易に作成でき、生体への移植後は所望の期間経過後分解吸収されるスポンジ状成型物、軟骨組織再生用基材、軟骨組織再生用基材-軟骨細胞複合体の提供。

【解決手段】乳酸、グリコール酸もしくはカプロラク톤のいずれかの重縮合体又はこれらの共重合体のいずれかからなり細胞保持構造を有するスポンジ状成型物、乳酸、グリコール酸もしくはカプロラク톤のいずれかの重縮合体又はこれらの共重合体のいずれかから構成される多孔体からなる軟骨組織再生用基材、該軟骨組織再生用基材及び軟骨細胞を含有する軟骨組織再生用複合体、上記軟骨組織再生用基材に軟骨細胞を播種することにより軟骨再生する軟骨組織再生法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】乳酸、グリコール酸もしくはカプロラク톤のいずれかの重縮合体又はこれらの共重合体のいずれかからなり、細胞保持構造を有することを特徴とするスポンジ状成型物。

【請求項2】乳酸、グリコール酸もしくはカプロラク톤のいずれかの重縮合体又はこれらの共重合体のいずれかから構成される多孔体からなることを特徴とする軟骨組織再生用基材。

【請求項3】多孔体がスポンジ状である請求項2記載の軟骨組織再生用基材。

【請求項4】多孔体が細胞接着促進物質でコートされるものである請求項2または3記載の軟骨組織再生用基材。

【請求項5】請求項2乃至4のいずれかに記載の軟骨組織再生用基材及び軟骨細胞を含む軟骨組織再生用複合体。

【請求項6】請求項2乃至4のいずれかに記載の軟骨組織再生用基材に、軟骨細胞を播種することによって軟骨を再生することを特徴とする軟骨組織再生法。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

【発明の属する技術分野】本発明は、乳酸、グリコール酸もしくはカプロラク톤の重縮合体又はそれらの共重合体からなる生体吸収性高分子をスポンジ状にしてなる新規な成型物に関する。

【0002】また本発明は軟骨組織再建法において、軟骨組織を再生するための良好な足場となる新規基材及び該基材を用いた軟骨組織再生法に関する。

【0003】なお、「軟骨組織再建法」とは手術、外傷等によって喪失した軟骨組織を細胞培養法によって再構成し、それを患者に移植することにより軟骨を再生する方法である。

【0004】

【従来の技術】近年の細胞培養技術の進歩により、数々の動物細胞の培養が可能となり、またそれらの細胞から組織を再構築するという試みが行われつつある（細胞工学、14(12) 1995）。このような試みにおいて最も重要なことは播種する細胞が生体組織を再建するまでの足場となるマトリックスの作製である。

【0005】この分野において実用化面で最も進んでいるのは皮膚である。丸口らはコラーゲンをを用いた発泡体を作製し、これに線維芽細胞を播種、更にこの上部に表皮角化細胞を播種することによって表皮、真皮の構造を有する培養人工皮膚を作製した（Plast. Reconstr. Surg. 93: 537, 1994）。コラーゲンは生体適合性に優れ、また組織が再生された後には分解吸収されるため、このような目的には非常に適している。

【0006】軟骨の再生においても組織再建の試みが行われている。栈敷らは上記人工皮膚に使用したものと同

様のコラーゲンスポンジを足場として、これに軟骨細胞を播種することによって、軟骨組織の再建に成功している（Biomaterials 17 (1996) 155-162）。またVacantiらは生体吸収性高分子であるグリコール酸と乳酸の共重合体からなる繊維を基材としてこれに軟骨細胞を播種することによって軟骨組織を再生する試みを行っている（Plast. Reconstr. Surg. 88, 753, 1991）。

【0007】しかし、これらの方法ではいずれも基材の物性面に問題があり、実用的な軟骨組織の再生は難しい。すなわちコラーゲンスポンジを基材とする場合、コラーゲンは細胞培養の基材として非常に優れたものではあるが、一方で非常に柔軟なものしか作製できないため、必要とする形状を作製することは困難である。すなわち試験管内で必要な培養軟骨細胞が形成された後、生体に移植する場合に、ある程度の強度がないと、生体内で形を維持することはできない。また生体吸収性高分子を用いる場合でも、繊維を用いてマトリックスの基材を作る試みについても、自由に必要とする構造を有した基材を作製することは困難である。

【0008】従って理想的な軟骨細胞のマトリックスの基材として容易に3次元の形状を自由に作ることでできる素材が必要とされる。たとえば耳介の形成を行う場合にはマトリックスによって耳介の形状を形成した後、移植することによって組織が再生できるものが理想となる。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】従って、本発明の目的は、（1）軟骨細胞増殖のために最適な足場となり、

（2）適度な強度を有しており目的とする軟骨組織の形状を容易に作成することができ、さらに（3）生体に移植された後は所望の期間経過後、分解吸収される、という性質を備えたスポンジ状成型物、好ましくは細胞播種用基材、より具体的には軟骨組織再生用の基材を提供することである。

【0010】また、本発明の他の目的は、生体内で短期間に効率よく軟骨組織再生効果を奏する軟骨組織再生用基材—軟骨細胞複合体を提供することである。

【0011】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記諸目的を解決すべく鋭意検討した結果、軟骨細胞の足場として特定の生体吸収性高分子からなる多孔体を用いることによって上記性質を兼ね備えた軟骨組織再生用基材を提供することができることを知り、この知見に基づいて本発明を完成するに至った。

【0012】即ち、本発明の第一は、乳酸、グリコール酸もしくはカプロラク톤のいずれかの重縮合体又はこれらの共重合体のいずれかからなり、細胞保持構造を有することを特徴とするスポンジ状成型物である。

【0013】また本発明の第二は、乳酸、グリコール酸もしくはカプロラク톤のいずれかの重縮合体又はこれ

らの共重合体のいずれかから構成される多孔体からなることを特徴とする軟骨組織再生用基材である。なお、多孔体としては、より好ましくはスポンジ状のものが挙げられる。また、当該多孔体は細胞接着促進物質でコートされていてもよい。

【0014】さらに本発明の第三は、上記軟骨組織再生用基材及び軟骨細胞を含有する軟骨組織再生用複合体である。

【0015】さらにまた本発明の第四は、前記軟骨組織再生用基材に、軟骨細胞を播種し、移植することによって軟骨を再生することを特徴とする軟骨組織再生法である。

【0016】

【発明の実施の形態】本発明の成型物は、合成の生体吸収性高分子である乳酸の重縮合体（ポリ乳酸）、グリコール酸の重縮合体（ポリグリコール酸）、カプロラク톤の重縮合体（ポリカプロラクトン）、乳酸とグリコール酸との共重合体、グリコール酸とカプロラクトンとの共重合体、乳酸とカプロラクトンとの共重合体又は乳酸、グリコール酸及びカプロラク톤の共重合体のいずれかを、適当な処理をすることによって多孔質状とし、所望の形態に成型してなる外科用成型物である。

【0017】ここで多孔質状とは、内部に多数の小さな空隙（孔：ポア）を有する形状のものを意味し、具体的にはスポンジ状、蜂の巣状又はそれらと同等なものが挙げられるが、好ましくはスポンジ状である。

【0018】その孔径は、細胞、好ましくは軟骨細胞を保持できる構造であれば特に制限はされないが、通常1mm以下、好ましくは5～100 μ mであり、密度は0.1～10g/cm³、好ましくは1～5g/cm³である。

【0019】用いられる重合体の平均分子量、混合組成、重合比、重合法等は特に制限されないが、調製された成型物に細胞を播種した場合、該細胞が成型物表面または内部に付着・保持され、成型物とともに培養された場合に細胞が増殖できる性質を有していることが好ましい。より好ましくは多孔質状に成型してなる成型物が、細胞を播種し軟骨を形成したときに軟骨としての適当な強度、弾性を有し、かつ軟骨が再生された後は分解吸収されるように適宜選択される。

【0020】例えば、本発明の成型物の一態様としては、上記重縮合体または共重合体からなる成型物であって、その引張破断強度が0.1kgf/cm²以上で成形後の粘度平均分子量が1～50万の範囲であり、しかも体内に埋植された場合には、1年以内好ましくは6ヶ月以内に分解吸収されるものが挙げられる。

【0021】上記特性を有するスポンジ状成型物の製造方法は、特に制限されないが、一態様として例示するならば、粘度平均分子量として1～50万、好ましくは5～30万を有する重縮合体又は共重合体の溶液を所望の型

枠に入れ、凍結後、真空凍結乾燥することによって所望の形態のスポンジ状成型物を得ることができる。あるいは作製したスポンジを適当な形にカットすることによって成形することも可能である。

【0022】より具体的に説明すると、例えば、本発明で用いられる乳酸重縮合体（ポリ乳酸）は、光学活性を有するL体又はD体の乳酸から常法（C. E. Lowe, U. S. P. 2,668, 162号）に従って乳酸の環状二量体であるラクチドを合成した後、そのラクチドを開環重合することによって得られるものである。重合は、一般に減圧下または不活性ガス雰囲気下において重合温度100～250℃で、スズ系、亜鉛系、アルミニウム系等の化合物を触媒として行うことができる。

【0023】また、本発明においては上記乳酸重縮合体に代えて、グリコール酸の重縮合体（ポリグリコール酸）又はカプロラク톤の重縮合体（ポリカプロラクトン）も用いられる。これらの製造方法も、常法に従って行うことができる。

【0024】更に、本発明において、上記重縮合体に代えて、乳酸、グリコール酸又はカプロラク톤のいずれかから構成される共重合体を用いることができる。

【0025】かかる共重合体は、ランダム共重合体又はブロック共重合体のいずれであってもよい。これらのブロック共重合体は、種々の長さの一連の鎖セグメントからなり、各セグメントはモノマーのホモポリマーからなるか、あるいは二種以上の共重合体を含むランダム共重合体からなるものであってもよい。

【0026】上記特性を有するスポンジ成型物を構成するものであれば、これら共重合体の配合比は特に制限されず、また常法に従って製造することができる。

【0027】上記本発明のスポンジ状成型物は、その用途を限定するものではなく、その特性を生かしていかなる用途にも使用することができる。好ましくは、細胞の足場としての用途または細胞播種材料としての用途が例示される。

【0028】また当該成型物の成型の態様も特に制限されず、目的に応じて適宜選択することができる。

【0029】本発明に係る軟骨組織再生用基材は、上記成型物の一態様として挙げられるものである。この場合の成型の態様は、例えば耳や鼻等、所望の再建対象物の形態を考慮して、それらの形に適合するよう加工される。

【0030】「軟骨組織再生用基材」とは、in vitroで軟骨細胞を播種した場合に、該細胞が好適に増殖する足場となり、また該細胞を含んだ状態で生体内に埋め込んだ場合には、その中の軟骨細胞が速やかに分化・再生し、それとともに基材自身は分解吸収されるものをいう。本発明の「軟骨組織再生用基材」は、とりわけ軟骨様の適当な強度、弾性を有しているため扱い易く、また軟骨細胞を含有させ生体内に移植した場合には軟骨組織

の再生が数週間という短期間で行われることを特徴とするものである。

【0031】かかる効果を奏する本発明の軟骨組織再生用基材は、前述の成型物の中でも生体への埋植後、形の崩れない強度と、一定の柔軟性、さらには6ヶ月程度で分解吸収されるという特性を有するものが好適に挙げられる。

【0032】なお、本発明の成型物及び軟骨組織再生用基材は、更にその多孔質表面が細胞接着促進物質によって被覆されていてもよい。

【0033】細胞接着促進物質とは、細胞の接着を促進する性質を有するものであればよく、特に制限はないが、具体的にはコラーゲン、ゼラチン等が例示される。

【0034】被覆方法は特に制限されず、常法に従って行うことができるが、簡便には後述の実施例2で示すように、多孔質状基材を調製後、細胞接着促進物質に浸漬し、その後再度凍結乾燥する方法が例示される。

【0035】また、本発明は上記軟骨組織再生用基材を用いた軟骨細胞複合体を提供する。

【0036】かかる軟骨組織再生用基材-軟骨細胞複合体は、上記軟骨組織再生用基材からなるマトリックスに軟骨細胞が含まれてなるものであり、軟骨組織再生用移植片もしくは軟骨組織再生用治療材として有用である。

【0037】調製方法は特に制限されないが、例えば前述の軟骨組織再生用基材を使用目的に応じて適当な大きさ・形状に調製した後、例えば、これに軟骨細胞分散液を注入して、5%CO₂/37℃インキュベーターにて培養後24時間程度培養する方法等が挙げられる。

【0038】用いられる軟骨細胞としては、好ましくは当該複合体が適用される被験者と免疫原性が近似もしくは同一のものが挙げられる。軟骨細胞は、常法に従って調整できるが、コラゲナーゼ等の酵素処理によって調整する方法が一般的である。

【0039】複合体を調整する際の軟骨細胞分散液の細胞濃度は、使用目的、使用部位、疾病の程度などによって適宜変更できるが、好ましくは軟骨組織再生用基材1cm³あたり、含まれる細胞濃度が1×10²個以上、好ましくは1×10³～1×10⁸個、さらに好ましくは1×10⁴～1×10⁷個となるように調整することが望ましい。

【0040】本発明の複合体を、例えば耳の軟骨の再建に用いる場合は、耳の適用部位に適合するよう成型・加工した軟骨組織再生用基材に軟骨細胞分散液を注入して、一定期間培養して調製した本発明複合体を、該耳の適用部位に埋め込むことにより行われる。

【0041】なお、本発明の成型物及び軟骨組織再生用基材は、合成の生体吸収性高分子を用いているため、コラーゲンなどの天然高分子とは異なり、安定した均一の品質のものを提供することができ、また簡便に滅菌処理等ができるため細菌の増殖や汚染を防止することがで

き、さらに分子量、重合度、混合組成を自由に調整できるため、所望の強度や分解速度を有する基材の調製が簡便にできるという点でも有用である。

【0042】また、本発明は上記軟骨組織再生用基材に、軟骨細胞を播種することによって軟骨を再生することを特徴とする軟骨組織再生法である。

【0043】軟骨細胞の播種方法、用いられる軟骨細胞等は、前記の通りである。また、軟骨の再生は、播種された軟骨細胞を含む軟骨組織再生用基材（軟骨組織再生用複合体）を生体内に埋め込む方法、又は生体外で培養することにより行われる。

【0044】生体外で培養し、軟骨組織が再生されたものについては、適宜生体内に埋め込むことにより軟骨組織の再建に使用される。この生体外で培養することによる軟骨組織再生法は、予め必要とする軟骨組織を再生し、それをストックしておけるといった利点がある。

【0045】

【実施例】以下、本発明の内容を以下の実施例及び実験例を用いて具体的に説明するが、本発明はこれらに何ら限定されるものではない。

【0046】実施例1 乳酸-カプロラクトン共重合体の発泡体の調製

乳酸/カプロラクトン共重合体(P(LA-CL))

(50:50)2gを100mlジオキサンに入れ、40℃で攪拌溶解した。これをガラス製型枠に流延し、-30℃冷凍庫に入れ、1時間凍結させた後40℃、24時間真空凍結乾燥した。このようにして作製したスポンジ(基材1)は柔軟な性状を有していた。

【0047】これを走査電子顕微鏡で観察すると無数の孔が表面に露出した多孔体構造を呈しており、織布や不織布等の構造とは明らかに相違していた(図1参照)。

【0048】実施例2 ゼラチンコート乳酸-カプロラクトン共重合体の発泡体の調製

医療用ゼラチン2gを100mlの蒸留水に入れ、30℃で攪拌溶解した。これを実施例1で調製した基材1に十分浸潤させ、-135℃にて1時間凍結後、真空凍結乾燥した。このようにして作製したものを走査電子顕微鏡にて観察したところ基材1と同様に多孔体を呈していた(図2参照)。また基材1に比べると発泡スチロール状の硬さを呈し、カッターにて成形可能であった。

【0049】実験例1

上記実施例1及び実施例2で調製した各共重合体スポンジについて、乾燥状態及び湿潤状態での引張破断強度、引張破断伸びを測定した。測定は、20mm幅の試料を用いて引張速度500mm/分の条件で、オートグラフにて行った。尚、比較試料として、コラーゲンスポンジを用いて同様な実験を行った(比較例)。

【0050】結果を表1に示す。

【0051】

【表1】

	乾燥状態		湿潤状態	
	引張破断強度 (kgf/cm ²)	引張破断伸び (%)	引張破断強度 (kgf/cm ²)	引張破断伸び (%)
実施例				
1 共重合体スポンジ	0.33	194	0.30	176
2 ゼラチン被覆 共重合体スポンジ	1.45	20	0.30	134
比較例				
コラーゲンスポンジ	0.06	20	0.01	73

【0052】これから、本発明の共重合体スポンジは、コラーゲンスポンジよりも破断強度が格段向上し、破断伸びもよいことが分かる。また、細胞接着促進物質であるゼラチンで被覆することにより、引張破断強度が向上することが判明した。

【0053】実施例3

(1) 軟骨細胞採取

Lewis系4週令雄性ラット肋軟骨を無菌的に採取し、付着する軟組織を可及的に除去し取り出した軟骨を細片化した。次いで、酵素液〔第一液：0.1%EDTA（ナカライテスク社製）／PBS（－）（ローマン工業社製）、第二液：0.25%トリプシン－EDTA（ギブコ社製）／PBS（－）（ローマン工業社製）、第三液：0.1%コラゲナーゼ（和光純薬社製）／PBS（＋）（ギブコ社製）〕をそれぞれ入れた試験管中にこの軟骨組織を入れ、37℃でそれぞれ15分間、1時間、3時間処理して軟骨組織を分解した。採取した軟骨分散液を培地中（D-MEM（Dulbecco's Modified Eagle Medium；ギブコ社製）＋10%FCS（FETAL BOVINE SERUM）＋ペニシリン＋ストレプトマイシン）に入れ、コンフルエント状態になるまで、約2週間、37℃、5%CO₂下で培養した。得られた培養液を0.25%トリプシン／PBS（－）で5分間処理して、1000rpm、10分間遠心分離し、軟骨細胞を回収した。

【0054】(2) 軟骨細胞播種

上記方法にて採取した軟骨細胞を実施例1及び2で調製した基材1及び基材2（1cm×1cm）それぞれに5×10⁶Cells/50μlの濃度で注射器にて注入し、3時間、37℃、5%CO₂下で培養後、培地を2ml追加してさらに24時間培養して、軟骨組織再生用基材－軟骨細胞複合体を調製した。

【0055】実験例2 移植実験

実施例3で調製した軟骨組織再生用基材－軟骨細胞複合体を、ヌードマウス（KSN-nuSlc：日本エスエルシー）の背部皮下に移植した。

【0056】移植4週後に移植片を回収し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い組織を観察した。また軟骨プロテオグリカンについてはAlcian-Blue染色、Azan染色及びAggrecan免疫抗体染色を行い、光学顕微鏡で観察した。移植4週後の組織切片を観察した結果、Azan染色及びAggrecan免疫抗体染色において複合体内部に軟骨塊の形成を示す高い染色域が認められた（各々図3及び4参照）。

【0057】以上のことから、本発明の多孔質状の軟骨組織再生用基材は、適度な強度と弾性を有するため、3次元の形状を自由に作れて患部の形状に応じた成型加工が容易にでき、さらにはそれに軟骨細胞を付着させて生体内に埋め込むことによって、わずか数週間という短期間で軟骨組織の再生が可能であることが判明した。

【図面の簡単な説明】

【図1】 実施例1で調製した、乳酸／カプロラクトン共重合体のスポンジ状多孔体の構造を走査電子顕微鏡で観察した、図面に代わる電子顕微鏡写真である。

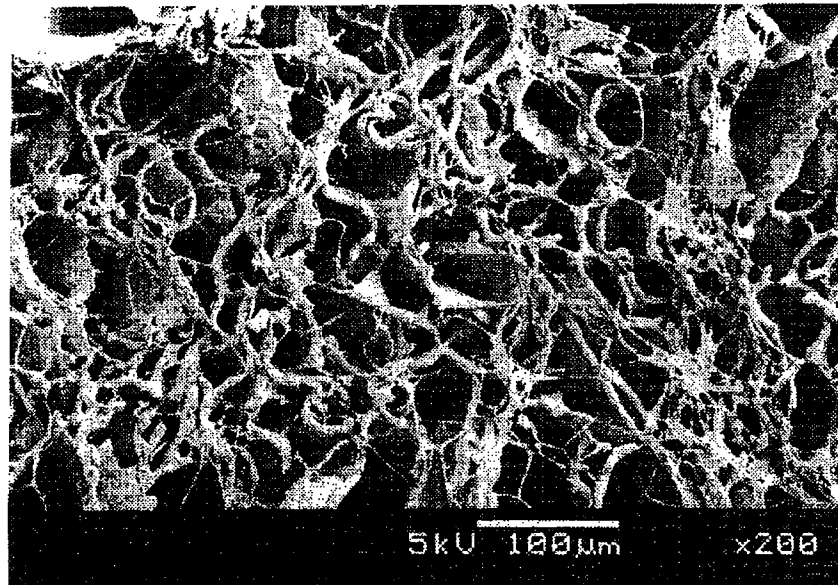
【図2】 実施例2で調製した、ゼラチン被覆－乳酸／カプロラクトン共重合体のスポンジ状多孔体の構造を走査電子顕微鏡で観察した、図面に代わる電子顕微鏡写真である。

【図3】 本発明の基材－軟骨細胞複合体を移植後、4週間めの軟骨塊形成状態をAzan染色で示す図面に代わる写真である。

【図4】 本発明の基材－軟骨細胞複合体を移植後、4週間めの軟骨塊形成状態をAggrecan免疫抗体染色で示す図面に代わる写真である。

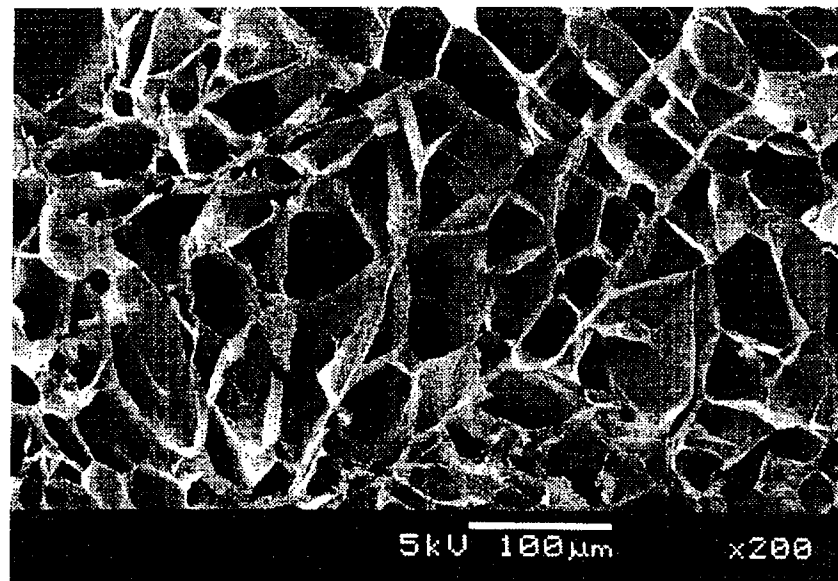
【図1】

図面代用写真



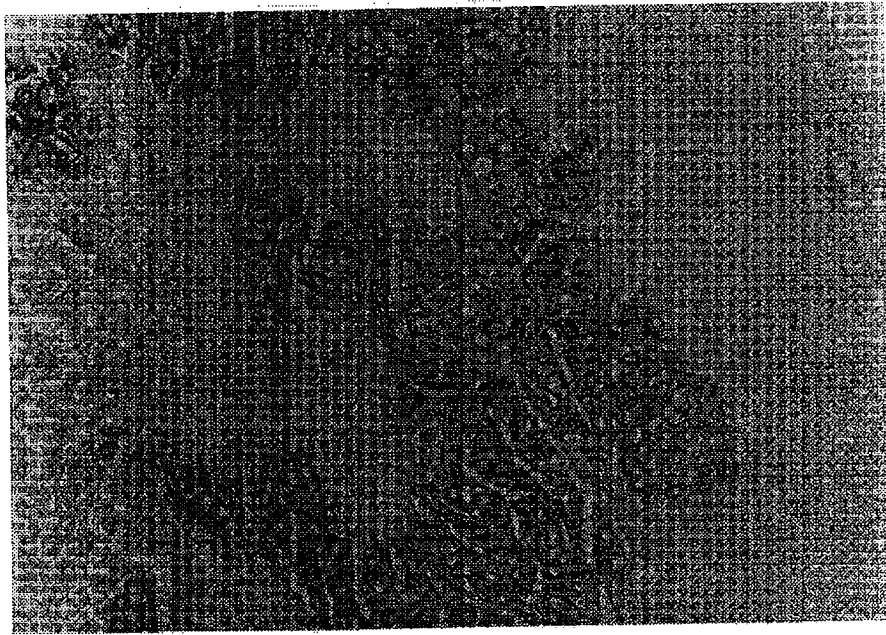
【図2】

図面代用写真



【図3】

図面代用写真(カラー)



【図4】

図面代用写真(カラー)

